第2章　材料と方法

2-1実験動物及び試薬

アフリカツメガエル（Xenopus laevis）の成体は、ワタナベ増殖（兵庫）より購入した。アフリカツメガエルは23℃で飼育し、アフリカツメガエル用飼料（ワタナベ増殖）を餌として与えた。

本研究で使用した試薬類は、特に断らない限りNacalai Tesque,Inc.より購入したものである。本文中略称で示した試薬類の名称は以下のとおりである。

Amp: ampicillin sodium salt

MMR: Marc’s Modified Ringers（100mM NaCl,2mM KCl,1mM MgSO₄・H₂O,2mM CaCl₂、5mM Tris-HCl;pH7.8）

FDL: Dextran, Fluorescein, 10,000 MW, Anionic, Lysine Fixable (Fluoro-Emerald)（invitrogen）

APS: ammonium peroxydisulfate

BPB: bromophenol blue

NBT/BCIP: nitro-blue tetrazolium chloride/5-bromo-4chloro-3’-indolylphosphatase p-toluidine sait

PVDF: polyvinylidene difluoride（Merck Millipore）

SDS: sodium lauryl sulfate

Tris: Tris（hydroxymethyl）aminomethane

TEMED: N,N,N’,N’-tetramethylenediamine

実験方法

2-1-1プラスミド抽出

Xtdrd6 tudor 5&6 in pET 21a/XL1 BlueをPlusgrow/Ampプレート（25mg/mlのAmpを含んだPlusgrow, 1.5％ w/v agar）からとりWizard ® Plus SV Minipreps DNA Purification Systemで目的のプラスミドDNAを抽出した。Plusgrow/Ampプレートからコロニーを爪楊枝でかき取り250μlのCRA（50mM Tris-HCl (pH 7.5) ,10mM EDTA,100µg/ml RNase A）に懸濁した。次に250μlのCLA（0.2M NaOH, 1% SDS）と10μlのAlkaline Protease Solutionを加え穏やかに転倒混和し、室温で5分間インキュベートし、さらに350μlのNSB（4.09M guanidine hydrochloride,0.759M potassium acetate, 2.12M glacial acetic acid）を加え穏やかに転倒混和した後遠心（15000rpm,5min,23℃）して上清をカラムに移し遠心（15000rpm,1min,23℃）した。フロースルーをデカントで捨て750μlのCWA（162.8mM potassium acetate ,22.6mM Tris-HCl (pH 7.5) ,0.109mM EDTA (pH 8.0)）をカラムに入れ遠心（15000rpm,1min,23℃）し、さらにその後フロースルーをデカントで捨て250μlのCWAをカラムに入れ遠心（15000rpm,2min,23℃）した。カラムを新しい1.5mlチューブに入れ替え、30μlのNuclease-Free Waterを加えて5分静置してのちに遠心（15000rpm,1min,23℃）した。その後さらに20μlのNuclease-Free Waterを加えて5分静置してのちに遠心（15000rpm,1min,23℃）した。フロースルーをプラスミドDNA溶液として回収した。

2-1-2トランスフォーメーション

Competent細胞（Escherichia coli BL21 株）50μlに4μlの抽出したプラスミドDNAを加え氷上に30分間置いた。その後42℃で50秒処理し、再び氷上に置いた。そこに500μlのPlusgrow/Amp（25mg/mlのAmpを含んだPlusgrow）を加え37℃ 30分保温した。そのうち300μlをPlusgrow/Ampプレート（1.5％ w/v agar）上にまいてコロニーを完成させた。5mlのPlusgrow/Ampに培養させたコロニーを加え、3時間培養させた。その後培養させたPlusgrow/Ampのうちの3.5mlと1.5mlの50%グリセロールを混合し、1mlずつ-60度で冷凍保存した。

2-2抗体精製

2-2-1

2つの250ml LB（0.5% w/v yeast extract, 1% w/v NaCl, 1% w/v tryptone）/Amp（25mg/mlのAmpを含んだLB）溶液に上記で冷凍保存しておいた1ml大腸菌入りPlusgrow/Amp溶液をそれぞれ加え37℃で培養した。OD600を0.5～0.6ユニットになるまで30～60分ごとに測定した。250ml LB/Amp溶液それぞれに0.5MのIPTGを250μlずつ入れ37℃で2時間培養した。その後50mlチューブに移し替え遠心（3000rpm,30min,4℃）した。遠心後にペレットを10ml（20mMTris-HCl pH8.0,300mMNaCl）に懸濁した。懸濁溶液を50mlチューブに移し超音波破砕（φ14 , DUTY 60, OUTPUT 4: TOMY）を3分、休み3分を5回繰り返した。その後1.5mlチューブに分注し遠心（20000rpm,2min,4℃）し、上清を取り出した。1ml（20mMTris-HCl pH8.0,300mMNaCl）にimidazoleを溶かし、上清に加えた。この時全体のimidazoleの濃度が10mMになるようにimidazoleの量を調節した。

2-2-2Chelating Sepharose Fast Flow

15mlチューブにゲルを入れ遠心(2000rpm,5min)し、ゲルを沈降させゲルが2mlになるように調整した。次に上清を廃棄し、10mlの精製水を加えて再懸濁後カラムに移して溶出した。1mlの0.1MNiSO₄を加えて5分振盪しゲルを再懸濁させ、溶出した。10mlの精製水で洗浄し、Start buffer（20mMTris-HCl pH8.0,300mMNaCl,10mM imidazole）で洗った。その後ゲルが入ったカラムにサンプルを入れ上蓋で密閉し、室温で30分攪拌した。下部のキャップを開け、流出物をチューブに回収し、50mlのStart Bufferを加え洗浄液をチューブに回収した。50mM,100mM,200mM, 300mM imidazole入りの20mMTris-HCl pH8.0, 300mMNaCl、50mM EDTAの順で10mlずつ溶出した。溶出したもののうち100mM,200mM imidazole入りの20mMTris-HCl pH8.0,300mMNaClを2mlまで濃縮した。（Amicon® Ultra-4 centrifugal Filters: Merck Millipore）濃縮したサンプルをPierce® BCA Protein Assay Kit: Thermo scientificを用いて濃度を測定した。濃縮したサンプルを透析チューブに入れ1回目精製水1時間、2回目精製水1時間、3回目NaHCO₃,NaCl pH8.3 1時間、4回目 NaHCO₃,NaCl pH8.3 一晩で透析した。

2-2-3CNBr-activated Sepharose 4B

透析したサンプルを1.4mlの0.5 M NaCl を含む 0.1 M NaHCO3 pH 8.3 のカップリング緩衝液に溶解させた。0.29gの CNBr 活性化セファロース 4B を秤量し、凍結乾燥した粉末を1mM HClで洗浄したリガンドを含むカップリング溶液とゲルを栓付き容器に入れ、室温で1時間混合する。過剰なリガンドを7mlのカップリングバッファーで洗い落とす。0.1 M Tris- HCl buffer, pH 8.0に移し替え、2時間静置した。7mlの0.1M酢酸/酢酸ナトリウム、pH4.0、0.5M NaClでの洗浄と、7mlの0.1M Tris-HCl、pH8、0.5M NaClでの洗浄を3回繰り返す。1mlの0.1 M Tris- HCl buffer, pH 8.0を加え抗体を1ml抽出した。

2-3-1ガラスマイクロピペットの作成

顕微授精用のガラスマイクロピペットは30μl用のマイクロキャピラリー（フナコシ株式会社）をガラス電極作成機（PN-3;NARISIGE）で引き延ばした後、この注射針の先端部分を研磨機（EG-40;NARISIGE）を用いて約20°の角度で研磨し針先が10μlになるように調整した。その後Ｈ₂Ｏ、ethanolで順次洗浄した。

2-3-2胚の調整

アフリカツメガエルの成体雌にhuman chorionic gonadotrophin（あすか製薬）500単位を注射し活性炭フィルターを通した井戸水に移し、16℃で飼育し翌日卵を絞り出した。一方、生態雄から精巣を摘出し、これを1×MMR中で細断することにより精子懸濁液を調整した。絞り出した卵に精子懸濁液をかけて5分後に1/10MMRを加えて受精させた。1/10MMRを除いた後、２％ cystein（pH 7.8~8.2）で処理することでゼリー層を除いた。これを1/10MMRで4回洗い32細胞胚になるまで23℃で保存した。胚の発生段階はNieuwkoopとFaber（1967）の分類に従った。

2-3-3マイクロインジェクション

25mg/mlのFDL（invitrogen） 1μlをTbs 24μlに溶かし1mg/mlのFDLに調節した。抗体を用いたほうも同様に25mg/mlのFDL 1μlを抗体 24μlに溶かし1mg/mlのFDLに調節した。注射針にシリコンオイルを充填した後インジェクターに装着し、αXTdrd6抗体、Tbs、αXTdrd6抗体・FDL、Tbs・FDLをそれぞれ顕微注射した。１×MMRに溶解した6％Ficoll溶液が入ったシャーレの底にメッシュ（1mm×1mm）を置き、その上に試料を植物極側が上になるように並べた。実体顕微鏡下にインジェクターと試料が入ったシャーレを設置し、32細胞胚の植物極側の細胞質すべてにαXTdrd6抗体、Tbs、αXTdrd6α抗体　1mg/ml FDL入り、Tbs　1mg/ml FDL入りを4.6nlを顕微注射した。3時間後１×MMRに溶解した6％Ficoll溶液、Ｈ₂Ｏ半々の溶液に移した。1日後、1/10×ＭＭＲ溶液に移しStage49まで育てた。

2-4SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-polyacrylamide gel electrophoresis:SDS-PAGE）

分離ゲルは10％のポリアクリルアミド溶液（9.69% w/v acrylamide, 0.27% w/v N,N’-methylenebisacrylamide, 0.1% w/v SDS, 0.055% v/v TEMED, 0.077% w/v APS, 375mM Tris-HCl:pH8.8）をゲル板（厚さ 1mm×幅 10.5cm×高さ 10cm）に流し込み、isopropyl alcoholを重層してゲル化させて作成した。Isopropyl alcoholを除去し、分離ゲルの上に濃縮ゲル溶液（4.38% w/v acrylamide,0.12% w/v N,N’-methylenebisacrylamide,0.1% w/v SDS, 0.1% v/v TEMED, 0.06% w/v APS, 125mM Tris-HCl:pH6.8）を流し込み、コームを挿入してゲル化させた。ゲル板を電気泳動槽（AE-6530M:ATTO）にセットし、泳動用バッファー（25mM Tris, 192mM glycine, 0.1% w/v SDS）で泳動槽を満たした。泳動するサンプルを5分間湯煎した後、コームで形成したウェルにサンプルを流し込み、120Vの低電圧で泳動した。この時、空いたウェルのひとつに分子量マーカー（Precision Plus Protein Standards: BIO-RAD）とサンプルにsample bufferを加えたものを10μlをそれぞれ流し込み、同時に泳動した。BPBがゲルの下端から約0.5㎝まで達した時点で泳動を終了し、ゲルをゲル板から外した。

2-5ウェスタンブロット

2-5-1PVDF膜への転写

電気泳動中にPVDF膜と chromatography paper（3MM CHR: GE Healthcare）6枚をゲルと同じサイズに切った。PVDF膜はmethanolに浸し純水で軽く洗った後、Anode buffer Ⅱ(25mM Tris, 10% v/v methanol)で平衡化を行った。電気泳動終了後、ゲルをゲル板より外した。転写板（日本エイド―）にAnode bufferⅠ(300mM Tris, 10% v/v methanol)に浸したchromatography paper 2枚、Anode buffer Ⅱに浸したchromatography paper1枚、PVDF膜、ゲル、Cathode buffer（25mM Tris,40mM glycine, 10% v/v methanol）に浸したchromatography paper3枚の順に重ね、1.2mA/cm³の定電流で1時間転写した。転写終了後、PVDF膜をmethanolに浸し、その後37℃で15分乾燥させた。

2-5-2XTdrd6の検出

乾燥したPVDF膜をDIGⅡ（1.5% blocking reagent[Roche], 100mM maleic acid, 150mM NaCl; pH7.5）1.5mlとDIGⅠ（100mM maleic acid, 150mM NaCl; pH7.5）8.5mlの混合溶液で室温1時間処理した後DIGⅠとDIGⅡの混合溶液で1000倍希釈したAnti Mouse IgG AP標識: invitrogenで室温・30分反応させた。反応終了後DIGⅠでPVDF膜を5分間×3回洗浄した。処理済みのPVDF膜を発色用バッファーで（96mM Tris,96mM NaCl,50mM MgCl₂: pH9.5）で処理した後に、NBT/BCIP（Roche）を発色用バッファーで50倍希釈した液に浸すことでシグナルを検出した。

2-6免疫組織化学

2-6-1生殖巣の固定・脱水・包埋

生殖巣を摘出後、4% paraformaldehyde in 70% PBS（136.9mM NaCl, 2.7mM KCl, 8.1mM Na₂HPO₄, 1.5mM KH₂PO₄）に移し、室温で2～3時間固定した。固定後、組織を70％ ethanolに移し30分間放置した。その後、80%・90%・95%・100%・100% ethanol中でそれぞれ30分間処理することで完全に脱水した。脱水後、組織を安息香酸メチルに入れた。組織が沈下した後、さらに新しい安息香酸メチルに移して20分間放置した。その後、lemosol（和光純薬）に移し、20分間放置した。次に、70℃で加温融解したparaffinに30分間入れた。新しいparaffinに移し30分間処理することをさらに２回行った後、室温でparaffinを固めることで組織の包埋を行った。

2-6-2切片の前処理

包埋した組織を7μmの厚さに切り、50℃に加温した水上に切片を浮かべることで進展させたのち、MAS-coated slide glass（MATSUNAMI）に張り付けた。その後、スライドガラスを37℃で3時間放置することで切片を乾燥させた。乾燥後、スライドガラスをxylene中に移し、10分間×２回放置することで脱paraffinを行った。脱paraffin後、100%・100%。90%・70% ethanolに順次3分間ずつ浸すことにより加水を行った。その後、水道水の入った容器中に移し、15分間以上放置することで完全に加水した。加水後、スライドガラスを抗原賦活化用buffer（10mM trisodium citrate dehydrate: pH6.0）に移して、120℃で5分間処理することで抗原を賦活化した。

2-6-3抗体反応と発色

加水した切片をDIGⅠbuffer中に移し、5分間洗浄した。洗浄後、liquid blocker（大道産業）で組織の周りをマーキングして、20μlのDIGⅡbuffer を試料の上に滴下して室温、湿室中で1時間放置することでblockinを行った。Blocking終了後、スライドガラス状に残っているDIGⅡbufferを取り除き、αXTdrd6 antibodyを40μl滴下して4℃、湿室中で一晩放置した。反応終了後、スライドガラスをDIGⅠbufferで10分間×3回洗浄することで過剰な抗体を除いた。その後、DIGⅡbufferで希釈したアルカリフォスファターゼ結合抗ウサギ抗体（Millipore）終濃度10μg/mlを20μl滴下して室温、湿室中で30分間放置した。反応終了後、スライドガラスをDIGⅠbufferで10分間×3回洗浄することで過剰な抗体を除き、発色用buffer（A液[100mM NaCl,100mM Tris-HCl(pH9.5)]：B液[1M MgCl₂]＝19：1）で5分間処理した。その後、発色用bufferで50倍に希釈したNBT/BCIP（Roche）を滴下し、適当に発色させた。

2-6-4hematoxylene・eosin染色

加水した切片をhematoxylene（Merck）で二分間染色した後、流水に1分間浸すことで余分な染色液を洗い流した。次に0.5% eosin（Schmid GmbH）で1分間染色し、流水に1分間浸すことで余分な染色液を洗い流し、70%・80%・90% ethanolの順に各30秒間ずつ浸し、95％・100％ ethanol の順に各3分間ずつ浸し脱水した。その後、xyleneに３分間浸す作業を2回行った後、Canada balsam（Meck）で封入した。

第3章　結果

NO IPTGとstartを比較すると37.5kDa付近のバンドと比較して100kDaにあるバンドの方が濃くなっているため目的のタンパク質であるXtdrd6 tudor 5&6が増殖したと判断した。次にsupとpptのバンドを比較するとsupでは濃くバンドがみられたpptでは薄いバンドしか見られなかった。このことから目的のタンパク質は溶解性がありsupに存在することが分かった。今回の実験ではsupを用いて抗原を精製することにした。FTでバンドが見えることでカラムにタンパク質がくっついたことを確認し、50mM,100mM,200mM, 300mM imidazole入りの20mMTris-HCl pH8.0, 300mMNaCl、50mM EDTAで溶出を行った。その結果、100mM,200mM imidazole入りの20mMTris-HCl pH8.0, 300mMNaClのバンドが濃くでたためこの二つを透析、濃縮することにした。（図1）

amido blackで染色したものとWestern blotで染色したものを比較すると同じ位置にバンドがみられるため今回精製した抗体はαXTdrd6抗体であると判断した。（図2）

精製したαXTdrd6抗体がPC,PG,SGで蛍光を示したことからPC,PG,SGに作用する抗体であることを示した。（図３）

植物極側のひとつの細胞に4.6ng,57.5ng,115ngのFDLを顕微注射すると57.5ng,115ngでは顕微注射した細胞が分裂しなくなり（矢印）、4.6ngでは分裂していた。このことからFDLの濃度は細胞分裂に影響を及ぼしていると判断した。4.6ngでは影響が出ていなかったことから今回の実験では1mg/mlのFDLを用いて実験を行った。（図4）

Tbs, TbsとFITCを顕微注射したものとαXTdrd6抗体, αXTdrd6抗体とFITCを顕微注射したものの発生過程で奇形になったものを比較するとαXTdrd6抗体, αXTdrd6抗体とFITCを顕微注射したほうは50％以上が奇形になったことが分かった。（表1）

ControlとしてTbsとFITCの混合溶液を顕微注射したものでは腸蛍光がみられ10以上の生殖細胞（矢頭）が蛍光を示していた。（図５）

αXTdrd6抗体とFITCを顕微注射したものでは腸蛍光はTbsを顕微注射したものと変わらなかったが生殖細胞（矢頭）が蛍光を示している数が減少した。このことから精製したαXTdrd6抗体は生殖細胞に影響を及ぼしていると考えられた。（図５,表2）

生殖腺付近でみられる粒上の蛍光が生殖細胞であるかどうかを判断するために固定して調べた結果細胞の大きさから生殖細胞であると判断した。（図6）

第5章　参考文献

K Ikenishi 1, T S Tanaka. Involvement of the protein of Xenopus vasa homolog (Xenopus vasa-like gene 1, XVLG1) in the differentiation of primordial germ cells. Dev Growth Differ. 1997 39:625-633

Fumiko Nishiumi, Tohru Komiya and Kohji Ikenishi. The mode and molecular mechanisms of the migration of presumptive PGC in the endoderm cell mass of Xenopus embryos. Develop. Growth Differ. (2005) 47, 37–48

Rafal P. Piprek , Malgorzata Kloc, Jean-Pierre Tassan, Jacek Z. Kubiak. Development of Xenopus laevis bipotential gonads into testis or ovary is driven by sex-specific cell-cell interactions, proliferation rate, cell migration and deposition of extracellular matrix. Developmental Biology 432 (2017) 298–310.

Masateru Hiyoshi, Nobushige Nakajo, Sin-Ichi Abe, Kazufumi Takamune. Involvement of Xtr (Xenopus tudor repeat) in microtubule assembly around nucleus and karyokinesis during cleavage in Xenopus laevis. Develop. Growth Differ. (2005)47, 109–117.

第6章　図版の説明

図１：